



Diseño y construcción de un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, Provincia de Pichincha, Ecuador

Jaramillo Dávila, Lennin Stiwari

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo


22 de septiembre de 2020




Document Information

Analyzed document Trabajo-de-Titulación_Stiwar-Jaramillo URKUND.docx (D79965304)
Submitted 9/26/2020 1:50:00 PM
Submitted by
Submitter email revargas@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address revargas.espe@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / bedon_quintana.pdf
Document bedon_quintana.pdf (D36495747)  1
Submitted by: mfloayza@espe.edu.ec
Receiver: mfloayza.espe@analysis.urkund.com

SA Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis Bedon.Quintana.final_rev_K.PONCE.docx
Document Tesis Bedon.Quintana.final_rev_K.PONCE.docx (D39043660)  1
Submitted by: lkponce@espe.edu.ec
Receiver: lkponce.espe@analysis.urkund.com

Firma:

Ing. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

C.C. 1708200538



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Diseño y construcción de un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, Provincia de Pichincha, Ecuador”** fue realizado por el señor **Jaramillo Dávila, Lennin Stiwar** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, septiembre de 2020

Firma:

Ing. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

C.C. 1708200538



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Jaramillo Dávila, Lennin Stiwar**, con cédula de ciudadanía 1003760806, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Diseño y construcción de un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, Provincia de Pichincha, Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, septiembre de 2020

Firma:

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dotted line. The signature is stylized and appears to be 'J. Stiwar'.

Jaramillo Dávila, Lennin Stiwar

C.C. 1003760806



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

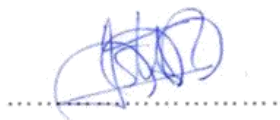
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Jaramillo Dávila, Lennin Stiwar**, con cédula de ciudadanía 1003760806, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Diseño y construcción de un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, Provincia de Pichincha, Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, septiembre de 2020

Firma:



Jaramillo Dávila, Lennin Stiwar

C.C. 1003760806

Dedicatoria

A mi familia, especialmente a mi madre Lucía Dávila, que me ha brindado un apoyo incondicional en las distintas etapas de mi formación profesional y ha estado siempre pendiente de todos mis logros personales.

Agradecimientos

A docentes y autoridades del Programa de Carrera en Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; que durante los años transcurridos me han formado con conocimiento y experiencias que forjaron mi crecimiento personal y profesional.

Al Ing. Rafael Vargas y a M. Sc. Karina Ponce quienes me guiaron con sus consejos y conocimientos para la realización de este trabajo de titulación.

A mis padres: Freddy y Lucía; por ser los principales motores del alcance de mis objetivos y también por los consejos, enseñanzas, valores y principios que me han inculcado.

A mis hermanas por estar conmigo en todo momento, en especial a Valeria y Paola por ayudarme a mejorar mi calidad de vida.

A Jemmy, por su incondicional apoyo, amor y motivación, especialmente en las últimas fases de este trabajo de titulación con quien he compartido innumerables ideas expresadas en este documento.

A mis amigos, compañeros, y a todas aquellas personas que me han brindado su apoyo a lo largo de mi trayectoria universitaria.

Índice de Contenidos

Análisis Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras	13
Índice de Ecuaciones.....	14
Índice de Abreviaturas	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo 1. Introducción.....	18
Formulación del Problema	18
Justificación del Problema	19
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20

Objetivos específicos	20
Marco Teórico	21
Fermentación	21
Fermentación láctica.....	22
Bacterias ácido-lácticas	22
Generalidades.....	22
Características y taxonomía.	23
Clasificación.....	25
Medio de cultivo más adecuado para BAL.....	27
Microorganismos Eficientes	27
Microorganismos de montaña (mm).....	28
Papel de las BAL en el suelo.....	28
Biorreactores	29
Biorreactor tipo Batch	29
Agitación	30
Biorreactor de tanque agitado.	30
Capítulo 2. Materiales y Métodos	32
Participantes.....	32
Zona de Estudio	32
Fase de campo	32

	10
Fase de laboratorio.....	33
Periodo de Investigación.....	33
Procedimiento de aislamiento.....	33
Preparación de sustrato y medios de cultivo	33
Toma de muestras.....	34
Muestras para aislamiento de bacterias ácido-lácticas.	35
Procesamiento de las muestras.	35
Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	35
Determinación de las características macroscópicas del cultivo.....	35
Identificación de bacterias ácido-lácticas.....	36
Generación de consorcio bacteriano y escalado a biorreactor de 10L	36
Evaluación de la cinética microbiana.	36
Diseño y Construcción del Biorreactor	37
Análisis Estadístico	40
Capítulo 3. Resultados	41
Evaluación del Sitio de Muestreo.	41
Procesamiento de Muestras	41
Aislamiento e identificación de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).....	42
Aislamiento por morfología colonial.	42
Identificación bioquímica de bacterias ácido-lácticas (BAL).....	43

	11
Generación del Consorcio Bacteriano y Escalado a Biorreactor	45
Diseño y Construcción del Biorreactor	46
Geometría del biorreactor	47
Sistema de agitación	47
Determinación de la potencia del motor de agitación.....	48
Sistema de transferencia de Calor	50
Construcción del biorreactor.....	50
Análisis de Conteos Bacterianos.....	52
Análisis Estadístico con RStudio V1.3	53
Determinación de la cinética bacteriana.....	55
Capítulo 4. Discusión	60
Conclusiones.....	66
Recomendaciones	67
Bibliografía	68
Anexos	75

Índice de Tablas

Tabla 1 Principales enzimas responsables de la fermentación	21
Tabla 2 Características principales de las bacterias ácido-lácticas (BAL)	24
Tabla 3 Taxonomía con los géneros más importantes de BAL	25
Tabla 4 Clasificación de las BAL según su temperatura ideal de crecimiento	26
Tabla 5 Cálculos utilizados para el dimensionamiento del biorreactor	38
Tabla 6 Datos de las distintas zonas de muestreo	41
Tabla 7 Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas en Agar MRS	42
Tabla 8 Resultados de las pruebas bioquímicas sometidas a las cepas bacterianas aisladas	44
Tabla 9 Morfología y longitud media de BAL aisladas	45
Tabla 10 Parámetros obtenidos del modelo logístico	57
Tabla 11 Fases de crecimiento a distintas horas de fermentación	57

Índice de Figuras

Figura 1 Principales flujos en los sistemas de agitación, A (axial), B (radial)	31
Figura 2 Ubicación geográfica del Bosque Protector Mindo Nambillo	33
Figura 3 Hojarasca en descomposición: zona de muestreo	34
Figura 4 Muestras de suelo en proceso de fermentación.....	42
Figura 5 Cepas bacterianas aisladas por morfología colonial	43
Figura 6 Tinción Gram de la cepa "2BAL"	44
Figura 7 Escalado del consorcio de bacterias ácido-lácticas	46
Figura 8 Gráfico de curvas que relaciona el número de potencia (N_p) con el número de Reynolds (Re).....	49
Figura 9 Biorreactor tipo Batch construido y ensamblado	51
Figura 10 Cuadrado secundario central (40x), a distintas horas de fermentación.....	52
Figura 11 Gráfico de interacción respecto a la producción de BAL	55
Figura 12 Modelo de regresión logística	56
Figura 13 pH vs tiempo a diferentes temperaturas	59

Índice de Ecuaciones

(Ec. 1) Volumen útil del biorreactor	46
(Ec. 2) Volumen total del biorreactor	47
(Ec. 3) Relación diametro - altura	47
(Ec. 4) Altura del cilindra	47
(Ec. 5) Alura del fermentador en relación al diametro	47
(Ec. 6) Ancho del agitador	48
(Ec. 7) Longitud del agitador	48
(Ec. 8) Distancia agitador-base del tanque	48
(Ec. 9) Anchura alabe	48
(Ec. 10) Longitud alabe	48
(Ec. 11) Potencia del motor de agitación	49
(Ec. 12) Diametro del tanque de calentamiento	50
(Ec. 13) Altura del tanque de calentamiento	50
(Ec. 14) Función logística de crecimiento	58
(Ec. 15) Ecuación cinética para 25°C	58
(Ec. 16) Ecuación cinética para 35°C	58

Índice de Abreviaturas

MM: Microorganismos de montaña

EM: Microorganismos eficientes

BAL: Bacterias ácido-lácticas

MRS: de Man Rogosa y Sharpe

RPM: Revoluciones por minute

W: Watts

drc(): Dose Response Curves

drm(): Dose Response Models

Resumen

En los últimos años, el uso de bacterias del ácido láctico (BAL) ha ido en aumento debido a sus numerosas aplicaciones en distintos procesos de producción industrial. Por consiguiente, los distintos enfoques de investigación deben centrarse en la producción a gran escala de estos microorganismos. El uso de BAL a partir de muestras de hojarasca de suelos primarios es una de las formas de mejorar la actividad agropecuaria y evitar el uso de agroquímicos. En este estudio se diseñó y construyó un biorreactor con un volumen útil de 10 litros, que cuenta con un sistema de agitación de 100 RPM y transferencia de calor automático mediante resistencias de calentamiento. Se aislaron un total de 6 cepas bacterianas a partir de muestras de hojarasca previamente fermentadas, de las cuales 4 fueron identificadas como BAL y resembradas en Agar MRS. Los conteos bacterianos procesados con el software estadísticos RStudio V1.3, usando la prueba heterocedástica de Welch demostraron que no existe diferencia significativa entre las temperaturas de 25°C y 35°C (p-valor: 0.630), de forma similar el análisis cinético mediante la función logística, determinaron cifras máximas de producción sostenible de 3.28×10^8 BAL/mL y 3.19×10^8 BAL/mL para 25°C y 35°C respectivamente y un tiempo de llegada a la fase estacionaria de 45 horas para ambas temperaturas.

Palabras Clave:

- **BIORREACTOR BATCH**
- **BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS**
- **FUNCIÓN LOGÍSTICA**
- **MICROORGANISMOS DE MONTAÑA**
- **MINDO**

Abstract

In recent years, the use of lactic acid bacteria (LAB) has been increasing due to its numerous applications in different industrial production processes. Therefore, different research approaches should focus on the large-scale production of these microorganisms. The use of BAL from litter samples from primary soils is one of the ways to improve agricultural activity and avoid the use of agrochemicals. In this study, a bioreactor with a useful volume of 10 liters was designed and built, which has a 100 RPM stirring system and automatic heat transfer through heating elements. A total of 6 bacterial strains were isolated from previously fermented litter samples, of which 4 were identified as BAL and re-seeded on MRS Agar. Bacterial counts processed with the RStudio V1.3 statistical software, using Welch's heteroscedastic test, showed that there is no significant difference between the temperatures of 25 ° C and 35 ° C (p-value: 0.630), in a similar way the kinetic analysis Using the logistic function, they determined maximum sustainable production figures of 3.28×10^8 BAL / mL and 3.19×10^8 BAL / mL for 25 ° C and 35 ° C respectively and an arrival time to the stationary phase of 45 hours for both temperatures.

Keywords:

- **BIOREACTOR BATCH**
- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **LOGISTICS FUNCTION**
- **MOUNTAIN MICROORGANISMS**
- **MINDO**

Capítulo 1. Introducción

Formulación del Problema

El suelo contiene una cantidad importante de microorganismos que cumplen funciones dinámicas y vitales para mantener en correctas condiciones este ecosistema. La descomposición de materia orgánica y el mejoramiento de la calidad del suelo se debe al correcto intercambio de nutrientes entre el suelo y los microorganismos (Atlas & Barthe, 2002).

La actividad metabólica de microorganismos benéficos del suelo se ve modificada por el uso de agroquímicos. Estas sustancias químicas son empleadas en la agricultura con el fin de controlar plagas agrícolas y conservar cultivos vegetales (García & Lazovski, 2011). Una de las dificultades es el inadecuado uso de estas sustancias, produciendo suelos infértiles y poco productivos (Chaves, Ortíz, & Ortíz, 2013).

Entre las alternativas para biofertilizar los suelos, están los inoculantes microbianos de bosques primarios también llamados “microorganismos de montaña (MM)” pero han sido usados de forma artesanal añadiendo suero de leche como concentrado de bacterias ácido-lácticas, produciendo una posible contaminación si se agrega en concentraciones altas, modificando al microbiota nativa (Castro, 2014; Garro, 2016).

La cantidad de bacterias ácido-lácticas (BAL) usadas para fertilizar el suelo es considerable por lo que usar las BAL nativas de suelos primarios ayudaría a mejorar las condiciones de aquellos suelos infértiles. Para ello se debe implementar un sistema de producción en masa en donde se controlen parámetros fisicoquímicos (Teusink & Smid, 2006).

Justificación del Problema

En los últimos años, el uso de bacterias del ácido láctico (BAL) ha ido en aumento debido a sus numerosas aplicaciones en distintos procesos de producción industrial. Las BAL pueden usarse para producir químicos a granel (ácido láctico, polioles), generar bioingredientes (compuestos aromatizantes, exopolisacáridos, vitaminas) y como biopreservantes de alimentos. El sector en más crecimiento actualmente es aquel que se centra en la producción masiva de biomasa de BAL con distintos enfoques dentro de la industria como la fermentación y conservación de alimentos (Teusink & Smid, 2006; Huertas, 2010).

Industrias como “CHR HANSEN” con ingresos anuales de mil millones de dólares tienen como principal enfoque la producción masiva de biomasa, con aplicaciones en producción de probióticos para el área animal y humana, junto con la generación de cultivos iniciadores para diferentes industrias. Nuevas empresas ecuatorianas como BIOSOLUCIÓN M&V y BIOAGROPEC, forman la emergente matriz productiva enfocada en la producción de biomasa, con el fin de optimizar la actividad agropecuaria.

Una de las formas de mejorar la actividad agropecuaria, es empleando los microorganismos nativos de suelos primarios, llamados también “microorganismos de montaña (MM)” obtenidos a partir de la descomposición de las hojas (hojarasca), los cuales al ser bioaumentados en suelos que se encuentran desmineralizados, desgastados o contaminados por el uso de agroquímicos, pueden mejorar sus condiciones, nutriendo y mejorando su porosidad, logrando un suelo fértil (Tencio, 2014; Garro, 2016).

Actualmente los microorganismos de montaña son propagados mediante fermentación con melaza y polvillo de arroz, sin embargo, no se establecen condiciones de bioseguridad, asepsia y un correcto seguimiento de su eficiencia. Además, para proveer de mayor cantidad de bacterias ácido-lácticas se añade suero de leche al fermento, el cual puede llegar a contaminar el suelo (Guzñay, 2015; Castro, 2014).

En el Ecuador el desarrollo de estrategias de producción masiva de microorganismos es escaso, por ello, con el crecimiento industrial y el aumento en la demanda de recursos biotecnológicos (bioinsumos), es necesario estudiar y diseñar un biorreactor que sea capaz de permitir el control del entorno fisiológico de las bacterias del ácido láctico del suelo y que cuente con operaciones necesarias para el bioproceso, como el mezclado, control de parámetros fisicoquímicos y que permita la correcta inocuidad.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar y construir un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, provincia de Pichincha Ecuador.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar bacterias ácido-lácticas asociadas a la microbiota de hojarasca de la parroquia Mindo, mediante pruebas bioquímicas y cultivo en medio selectivo Man, Rogosa, Sharpe (MRS).
- Producir a escala piloto un consorcio de bacterias ácido-lácticas en una solución con melaza al 20 % p/v.

- Dimensionar y construir el biorreactor y determinar las condiciones óptimas de fermentación variando parámetros de temperatura vs. tiempo.

Marco Teórico

Fermentación

El estudio de este proceso bioquímico empieza con el químico y bacteriólogo francés Louis Pasteur durante las décadas de 1850 y 1860, el cual identificó que la producción de ácido láctico que agriaba el vino era producida por microorganismos (levaduras), estudiando así por primera vez a fondo este proceso metabólico llamado fermentación, el cual se produce principalmente por enzimas (Tabla 1), que catalizan compuestos orgánicos complejos a compuestos más simples (Akiko & Shurtleff, 2004).

Tabla 1

Principales enzimas responsables de la fermentación

Enzimas	Características
Proteasas	Descomponen moléculas de proteínas enormes en polipéptidos y péptidos, seguido por moléculas de fácil asimilación: los aminoácidos.
Amilasas	Transforman almidones y azúcares complejos en azúcares más simples.
Lipasas	Hidrolizan ácidos grasos complejos en moléculas más simples.

Nota: Recuperado de "A Brief History of Fermentation, East and West. Soyfoods Center". 2004 por Akiko, A., & Shurtleff, W.

Los microorganismos responsables de iniciar la fermentación en su mayoría son mohos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Actinomucor*, etc.), levaduras (*Saccharomyces*, *Xylonomycetes*, *Agaricostilbomycetes*, etc.) y bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, etc.). Cada tipo de microorganismo genera un tipo de fermentación distinta, entre ellas tenemos la fermentación alcohólica, butírica, acética y láctica (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Fermentación láctica. La fermentación láctica se basa en la oxidación de hidratos de carbono obteniendo como producto final, principalmente ácido láctico. Este tipo de bioproceso se puede dividir en dos tipos: fermentación láctica homofermentativa en la que se produce el 90 % o en su totalidad ácido láctico, y heterofermentativa en la que existe además de ácido láctico la generación de anhídrido carbónico y otros productos de fermentación (Pumarola, 1987).

El ácido láctico mantiene la estabilidad y seguridad microbiológica en los alimentos, mejorando su conservación, además junto a otros metabolitos producidos en la fermentación genera cambios fisicoquímicos y organolépticos en alimentos como la leche, hortalizas, legumbres y semillas produciendo productos de interés industrial como el queso, yogur, kéfir o vegetales fermentados (Yiu H. & Sherkat, 2006).

Bacterias ácido-lácticas

Generalidades. Las bacterias ácido-lácticas o frecuentemente llamadas "BAL", son un grupo diverso de microorganismos que provienen naturalmente de procesos de fermentación en plantas (maíz, cebada, col, ensilados), carne, productos lácteos y suelo (Teusink & Smid, 2006). Se adjudica al siglo XVIII cuando campesinos del supercontinente Euroasiático empezaron a estudiar los cambios organolépticos y

fisicoquímicos de la leche cruda en un ambiente cálido. Entre ellos la coagulación y el cambio de sabor fueron los más importantes, seleccionando aquellos de mejores características e inoculándolas en leche al siguiente día (Bedolla, 2012).

Actualmente las BAL son más conocidas por dar propiedades organolépticas y fisicoquímicas a la leche, e introducirlas al mercado como cultivos iniciadores para producir derivados lácteos como el yogur, requesón o quesos como el Cheddar y Camembert. En el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales, las BAL también forman parte de procesos de fermentación para producir salchichas, jamones curados, vinos, cerveza y licores fortificados. Son un importante foco de atención en la industria alimentaria por sus beneficios, pero también por el sabor desagradable que pueden generar (Teusink & Smid, 2006; Nguyen, Elegado, Librojo, Mabesa, & Dizon, 2010)

Las distintas investigaciones en pacientes con sistemas inmunes deteriorados indican que el uso de bacterias ácido-lácticas puede proporcionar una mejora en el microbiota intestinal compitiendo con organismos dañinos y evitando enfermedades como la endocarditis y septicemia (Passione, 2012). Así las BAL pueden actuar como alimentos probióticos, los cuales en la actualidad han sido formulados y estudiados, con el fin de mejorar la salud del consumidor (Ramirez & Rosas, 2011)

Características y taxonomía. Las bacterias ácido-lácticas como su nombre lo indica producen principalmente ácido láctico en el proceso de fermentación, hidrolizan péptidos de la leche y su crecimiento depende de la producción de proteinasas y peptidasas. Además, mediante la producción de exopolisacáridos (EPS) y la modificación de proteínas contribuyen a generar nuevas características organolépticas

(sabor, aroma, textura) y fisicoquímicas a los alimentos fermentados (Pescumma, 2008; Huertas, 2010).

Actualmente después de distintos análisis con ADN ribosómico, las BAL se clasifican en *Lactobacillales* y *Bifidobacteriales*, entre la característica principal tenemos que son: Gram positivas (ver tabla 2) y el orden con más aplicación industrial es el *Lactobacillales* (ver tabla 3).

Tabla 2

Características principales de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Parámetro	Característica
Tinción diferencial:	Gram positivas
Formadores de esporas:	No
Motilidad:	No
Morfología:	Cocos y Bacilos
Longitud:	Variable
Grosor:	0.5 – 0.8 µm
Tipo de respiración:	Anaerobias facultativas
Prueba catalasa:	Negativa
Prueba oxidasa:	Negativa
Clasificación nutricional:	Quimioorganotróficos
Fuentes de energía:	Carbohidratos fermentables y alcoholes

Nota: Recuperado de (Hugenholtz, 2008; Axelsson, 1993; Huertas, 2010)

Tabla 3

Taxonomía con los géneros más importantes de BAL

Orden	Familia	Género
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>
Lactobacillales	Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>
	Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>
	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc, Oenococcus, Weisella</i>
	Streptococcaceae	<i>Streptococcus, Lactococcus</i>

Nota: Recuperado de (Báez & González, 2017; NCBI, 2019)

Clasificación

Las bacterias ácido-lácticas se clasifican según el tipo de fermentación de azúcares en: homofermentativas y heterofermentativas. *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*, forman parte del primer grupo respectivamente, el 85% de la producción de ácido láctico viene de la glucosa (un mol de glucosa produce dos de ácido láctico). Entre las heterofermentativas tenemos: *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, las cuales solo producen el 50% de ácido láctico (un mol de glucosa produce una de ácido láctico), el resto es etanol y CO₂ (Carr,

Chill, & Maida, 2002). Otra forma de clasificarlas es según su temperatura de crecimiento (ver tabla 4).

Tabla 4

Clasificación de las BAL según su temperatura ideal de crecimiento

	Mesófilas	Termófilas
Temperatura ideal de incubación	20-25 °C	40-45°C
Volumen de cultivo líquido	1-2%	2-3%
Tiempo de incubación	18-20 h	2-4 h
Acidez final	0.8% de ácido láctico	0.9 % de ácido láctico
Géneros	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>

Nota: Recuperado de (Blanco, Delahaye, & Fragenas, 2006; Huertas, 2010)

Medio de cultivo más adecuado para BAL

El medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) es un cultivo selectivo utilizado frecuentemente para el desarrollo adecuado de BAL, su composición está basada en proteasa, peptona, glucosa, extracto de carne, extracto de levadura que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El Monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio, manganeso y el citrato de amonio proveen de cofactores para el correcto crecimiento bacteriano e inhibición del crecimiento de bacterias Gram negativas (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960; Corry, Curtis, & Baird, 2003).

Microorganismos Eficientes

Una de las ramas más importantes de la biotecnología es la “biotecnología verde” la cual se encarga en dar soluciones biotecnológicas al sector ambiental y agroindustrial, con la finalidad de potenciar el desarrollo económico del sector y reducir la contaminación ambiental (Sharma & Bharti, 2016). En este aspecto existen microorganismos eficientes (EM), que no presentan manipulación genética alguna y son nativos de hábitats naturales, son microorganismos benéficos con la capacidad de equilibrar el ecosistema en el que se encuentran, generando efectos positivos en el mismo (Hoyos, Alvis, & Jabib, 2008).

Los EM son una mezcla de microorganismos aerobios, anaerobios y algunos fotosintéticos obtenidos de la naturaleza. Tienen diversas aplicaciones industriales, demostrando beneficios para mejorar el procesamiento de alimentos, reducción de olores, tratamiento ambiental, en la producción agrícola natural sin el uso de agroquímico, entre otros (Feijoo, 2016).

Microorganismos de montaña (mm)

Se adjudicó el término “microorganismos de montaña” originariamente de la práctica japonesa que consistía en tomar hojas en descomposición (hojarasca) y el suelo del bosque nativo, para crear un fermento en condiciones anaeróbicas. Los MM están compuestos por hongos y bacterias y actualmente son usados para producir biofermentos, que pueden ayudar a lograr un suelo fértil (Kondo, 2015; Chiari, 2015).

Los estudios con MM demuestran su eficiencia sobre sistemas edáficos, mostrando cambios fenotípicos significativos a nivel del suelo y mejorando la dinámica de los microorganismos benéficos. Ayudando así al crecimiento vegetal y a la producción de metabolitos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos (Umaña, Rodríguez, & Rojas, 2017).

Los microorganismos de montaña comprenden aproximadamente 80 especies agrupados en 10 géneros, entre los más importantes tenemos: bacterias fotosintéticas (sintetizan nutrientes a través de energía solar), actinomicetos (hongos controladores de enfermedades), bacterias ácido-lácticas (control del hongo *Fusarium sp.*) y levaduras (transforman metabolitos de las raíces en nutrientes) (Hoyos, Alvis, & Jabib, 2008)

Papel de las BAL en el suelo.

La característica acidificante de las bacterias ácido-lácticas tiene un efecto antagónico frente a distintos patógenos del suelo. Además, las BAL pueden sintetizar de manera natural péptidos antimicrobianos como la bacteriocina nisina, que es un antibiótico peptídico policíclico, usado como bioconservante. La producción de diversos metabolitos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono (CO₂) también contribuyen a la bioprotección de suelos, mejorando así su

microbiota (Herida & Hernández, 2017; Siamansouri, Mozaffari, & Alikhani, 2013).

Biorreactores

Un biorreactor o fermentador satisface todas las necesidades para el microorganismo en crecimiento. Como el mezclado, termostatación, suministro de oxígeno, adición de nutrientes y control de pH, etc. Existen diferentes sistemas de cultivo, entre ellos el continuo y discontinuo son los más utilizados (Merchuk, 2007). Pueden clasificarse de acuerdo con su operatividad en biorreactores discontinuo (Batch), semicontinuo y continuo. Elegir un modo de operación de un sistema de cultivo, influirá en el diseño del biorreactor (Moncayo, 2008).

Para favorecer el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas (BAL), se requiere un diseño que permita el metabolismo respiratorio anaerobio facultativo, un sistema de agitación que permita la correcta homogenización de la fuente de carbohidratos y nutrientes. Además, debe ser un contenedor cerrado, hermético e impermeable, que no tenga riesgo de contaminación y mantenga la eficiencia en la producción de biomasa. (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006; Mitchell, Von Meien, & Krieger, 2003).

Biorreactor tipo Batch

La capacidad funcional de un biorreactor Batch o discontinuo corresponde a su carga inicial, ya que, en el transcurso del proceso de fermentación, no existe transferencia de materia y únicamente se extrae el producto al final del proceso (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006). Este tipo de procesos se usan para la mayoría de las reacciones químicas, bioquímicas y biológicas en un laboratorio. Los reactivos se colocan en un recipiente (tubo de ensayo, matraz, vaso de precipitación, etc.) y se agitan, después se calientan para que tenga lugar la reacción y luego se enfrían. Los

productos se vierten y, si es necesario, se purifican. Este proceso también se lo realiza en la industria, siendo la diferencia clave el tamaño del reactor y las cantidades de reactivos (CIEC, 2013).

Agitación

La agitación es un proceso importante en procesos de fermentación ya que permite evitar gradientes de temperatura y concentración, mejorando la eficiencia de producción de biomasa. Existen dos tipos de agitación principales en biorreactores, la primera funciona con máquinas (mecánica) y la segunda por medio de gas a presión (neumática), generalmente se usa oxígeno (Zlokarnik, 2002).

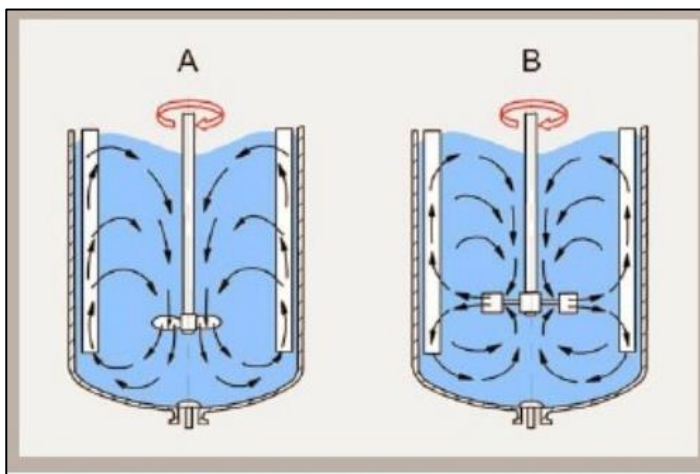
Por la naturaleza anaerobia facultativa de las BAL el tipo de biorreactor más utilizado para la producción de biomasa de estas bacterias es el biorreactor con agitación mecánica o también llamado “tanque agitado” (Merchuk, 2007).

Biorreactor de tanque agitado. Este tipo de biorreactores cuentan con un motor conectado a un eje transmisor de potencia que tiene acoplado aspas, paletas o discos de agitación que permiten la correcta mezcla en el tanque de fermentación (Vasquez, 2010). Existen dos principales flujos para el proceso de agitación (Figura 1), los cuales son:

- Flujo axial: Permiten distribuir de manera homogénea la potencia en el tanque, ocasionando corrientes paralelas al eje transmisor de potencia, entre estos tenemos las turbinas tipo hélice entre las más usadas.
- Flujo radial: Genera corrientes en dirección radial tangencial, entre estos tenemos los de turbina tipo Rushton con un buen perfil hidrodinámico.

Figura 1

Principales flujos en los sistemas de agitación, A (axial), B (radial).



Nota: El gráfico indica los distintos tipos de flujo. A) indica un movimiento axial y B) indica un movimiento radial. Recuperado de (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006)

Capítulo 2. Materiales y Métodos

Participantes

El trabajo de tesis fue realizado por Lennin Stiwari Jaramillo Dávila, con la guía del ingeniero Rafael Vargas, y la codirección de M. Sc. Lourdes Karina Ponce.

Zona de Estudio

La investigación se realizó en campo y a nivel de laboratorio.

Fase de campo

Se llevó a cabo en el Bosque Protector Mindo-Nambillo ubicado en la parroquia Mindo, cantón San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha, Ecuador; con temperatura media anual 22°C, precipitación 2500 mm/año, humedad media atmosférica es de 86% -92% (coordenadas 0°04'02.8" Sur, 78°45'01.9" Oeste) ; Altura media: 1615 m.s.n.m. Bosque Protector Mindo - Nambillo se encuentra a unos 80km al noroeste de Quito (figura 2).

Figura 2

Ubicación geográfica del Bosque Protector Mindo Nambillo



Nota: Recuperado de (Google Maps, 2020)

Fase de laboratorio.

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en el Cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha, en la Autopista General Rumiñahui, (coordenadas 0°18'53.5" Sur, 78°26' 36.5" Oeste).

Periodo de Investigación

El proyecto de tesis se ejecutó durante los meses de marzo a agosto de 2020.

Procedimiento de aislamiento.

Preparación de sustrato y medios de cultivo

Para la toma de muestras de hojarasca se preparó un sustrato basado en melaza, agua y arrozillo. De la siguiente manera: En un recipiente de vidrio estéril de

500 ml de boca ancha y tapa rosca se mezcló 130 g de arrocillo se humedeció con 12 g de melaza disuelta en 20 ml de agua (Castro, 2014).

Para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas se preparó medio sólido diferencial Agar MRS (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960; Corry, Curtis, & Baird, 2003).

Toma de muestras

La toma de muestras se realizó el 29 de febrero de 2020. Se localizó una zona sin afluencia de personas a 10 metros del sendero principal y se buscó un lugar con gran cantidad de hojas en descomposición (Figura 3).

Figura 3

Hojas en descomposición: zona de muestreo



Nota: El cambio de color de las hojas a tonalidades oscuras, es señal de descomposición.

Para evitar la contaminación de las muestras, se mantuvo condiciones estériles y se usó implementos de protección personal: guantes, mascarilla y mandil. Se determinó

la temperatura mediante un termómetro digital de bolsillo y el pH mediante un medidor de pH digital (Apera 700).

Muestras para aislamiento de bacterias ácido-lácticas. Se recolectó 260 g de hojarasca en fundas ziploc estériles por triplicado. No se colocó reactivos para preservar la muestra. Se mantuvo a temperatura ambiente y sin entrada de luz hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de las muestras.

Las muestras se inocularon en sustrato 1 hora después de su recolección debido a la distancia entre el laboratorio y el bosque protector.

Las tres muestras para aislamiento de bacterias ácido lácticas se inocularon en sustrato para microorganismos de montaña compuesto por melaza, semolina de arroz y agua. Se agitó y se mezcló hasta conseguir una masa compacta y manejable, eliminando posibles poros generados, favoreciendo así la fermentación. Se cerró herméticamente el recipiente y se dejó en fermentación por 20 días.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Después de los 20 días de fermentación en sustrato con melaza, se tomó un gramo de inóculo de microorganismos de montaña, se homogenizó en 9 ml de agua destilada estéril y se realizó diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

Cada dilución seriada se sembró en agar MRS mediante técnica de estriado con asa bacteriológica. Se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente.

Determinación de las características macroscópicas del cultivo.

Pasado las 24 horas, se evaluó las cepas de bacterias según los siguientes

criterios: forma de las colonias (puntiforme, circular, filamentosa, granular, rizoide, fusiforme, irregular), pigmentación (color), aspecto (brillante, translúcida, opaca), y elevación (plana, elevada, convexa, pulvinada, acuminada, umbonada).

Identificación de bacterias ácido-lácticas.

Conociendo que las bacterias ácido-lácticas son Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas. Se realizó una tinción Gram a todas las cepas bacterianas encontradas. También se observó las características que presentan las bacterias, con la ayuda del microscopio binocular marca "OMAX G015170", con un aumento de 100X,

La prueba de catalasa se hizo colocando una gota de peróxido de hidrogeno sobre un portaobjetos, se suspendió cada colonia y se detectó la formación de burbujas. La prueba de oxidasa se realizó utilizando el kit de detección citocromo oxidasa marca "BACTIDENT", que tiene como principio activo tiras con el reactivo dicloruro de N, N-dimetil-1,4-fenilendiamonio y se observó el cambio de coloración al cabo de aproximadamente 20 a 60 segundos.

Generación de consorcio bacteriano y escalado a biorreactor de 10L

Al finalizar el aislamiento y la identificación se raspo cada cepa con un asa bacteriológica y se inocularon en dos tubos de microcentrífuga con 1 mL de caldo MRS, homogenizando manualmente. Para el escalado de 50 mL, 1000 mL y 10000 mL se mantuvo constante las variables de temperatura para cada factor (25°C y 35°C) y se estableció un mínimo de concentración de inóculo de crecimiento de 3×10^6 BAL/mL.

Evaluación de la cinética microbiana.

Cada 8 horas se tomaron 10 mL de muestra del tanque fermentador en donde se

realizaron controles periódicos de pH y temperatura. El crecimiento fue cuantificado empleando cámara Neubauer Bluelight de 0,100 mm, con aumento de 40X, utilizando muestras a una dilución 10^{-2} .

Los resultados de incremento de biomasa fueron expresados en bacterias ácido-lácticas por mililitro (BAL/mL), las cuales fueron modelados mediante el modelo matemático logístico que tiene un mejor ajuste estadístico de crecimiento (Torres, Barbosa, Meyer, Noda, & Sarduy, 2012).

Diseño y Construcción del Biorreactor

Para el diseño del biorreactor se aseguró que todas las partes del sistema de fermentación cuenten con las mismas condiciones. Además, para una correcta optimización se siguió las siguientes normas operativas y de diseño (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006):

- Sin entrada de microorganismos patógenos y contaminantes.
- Volumen de fermentación constante, sin fugas y evaporación
- Temperatura homogénea y constante.
- Mantener un ambiente de micro-aerobiosis.
- Control de temperatura y pH.
- Volumen del cultivo correctamente mezclado y células uniformemente distribuidas.

Los cálculos geométricos y de potencia utilizados para el dimensionamiento del biorreactor se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5

Cálculos utilizados para el dimensionamiento del biorreactor

Cálculo	Fórmula	Donde:
Volumen útil del tanque de fermentación	$V_{util} = V_p \cdot t$	$V_p = \text{Volumen de producción al mes.}$ $t = \text{Tiempo de Fermentación}$
Volumen total cámara de cultivo	$V_T = \frac{V_{util}}{0.7}$	$0.7 = \text{volumen al 70\%}$
Altura de la cámara de cultivo	$h = \sqrt[3]{\frac{49}{9} \cdot \frac{V_T}{\pi}}$	$V_t = \text{Volumen total cámara de cultivo (cm}^3\text{)}$
Diámetro de la cámara de cultivo	$d = \frac{6h}{7}$	$h = \text{Altura de la cámara de cultivo.}$
Ancho del agitador	$D = \frac{2d}{3}$	$d = \text{Diámetro de la cámara de cultivo.}$
Longitud del agitador	$S = \frac{2d}{3}$	$d = \text{Diámetro de la cámara de cultivo.}$
Distancia agitador-base del tanque	$C = \frac{d}{6}$	$d = \text{Diámetro de la cámara de cultivo.}$
Anchura alabe	$W = \frac{D}{8}$	$D = \text{Ancho del agitador.}$

Cálculo	Fórmula	Donde:
Longitud alabe	$L = \frac{W}{2}$	$W = \text{Ancho del alabe.}$
Diámetro del tanque de calentamiento	$T = d$	$d = \text{Diámetro de la cámara de cultivo.}$
Altura del tanque de calentamiento	$C = \frac{h}{3}$	$h = \text{Altura de la cámara de cultivo.}$
Número de Reynolds	$N_{Re} = \left(\frac{D_r^2 N \rho}{\mu} \right)$	<p>$d = \text{diámetro del rodete (m)}$</p> <p>$N = \text{Velocidad de rotación } \left(\frac{rev}{s} \right)$</p> <p>$\rho = \text{Densidad de la mezcla del biorreactor } \left(\frac{kg}{m^3} \right)$</p> <p>$\mu = \text{viscosidad de la mezcla del biorreactor } \left(\frac{kg}{ms} \right)$</p>
Número de Potencia	N_p	Se calculará gráficamente: relación entre el Numero de Reynolds y el número de potencia en función de la forma de la paleta del agitador.
Potencia suministrada	P $= N_p \cdot \rho \cdot N^3$ $\cdot D^5$	<p>$N_p \cdot = \text{Numero de potencia}$</p> <p>$\rho = \text{Densidad de la mezcla del biorreactor } \left(\frac{kg}{m^3} \right)$</p> <p>$N = \text{Velocidad de rotación } \left(\frac{1}{s} \right)$</p> <p>$D = \text{Ancho del agitador (m)}$</p>

Nota: Recuperado de (Rivera & Suárez, 2010) (Bedón & Quintana, 2018) (CIEC, 2013) (Benz, 2011).

Análisis Estadístico

El estudio se basó en determinar la influencia de la temperatura y tiempo de fermentación en la producción de bacterias ácido-lácticas. Se utilizó el software estadístico RStudio V1.3 para los respectivos análisis de datos obtenidos, en donde se realizaron las siguientes pruebas:

- Kolmogórov-Smirnov (prueba de normalidad)
- Bartlett test (homogeneidad de varianzas)
- Welch's test (prueba F heterocedástica)
- Función logística (cinética de crecimiento)

Capítulo 3. Resultados

Evaluación del Sitio de Muestreo.

Se ubicó tres zonas del bosque protector Mindo Nambillo en donde se midió temperatura y pH del suelo de cada zona correspondiente a cada punto de muestreo, además de la altura y coordenadas geográficas (tabla 6).

Tabla 6

Datos de las distintas zonas de muestreo

Zona de Muestreo	T (°C)	pH	Altura (msnm)	Coordenadas
1	22.6	6.3	1350	0°04'59"S 78°46'17"W
2	22.4	6.0	1351	
3	21.9	6.1	1348	

Nota: Los datos de altura y coordenadas fueron tomados de (Google Earth, 2020).

Procesamiento de Muestras

Para aumentar la cantidad de microorganismos nativos en las muestras de suelo recogidas, estas se mezclaron con sustrato y pasaron por un periodo de fermentación durante 20 días. En la Figura 4 se puede observar que se evitó la entrada de oxígeno en cada muestra.

Figura 4

Muestras de suelo en proceso de fermentación



Nota: Las muestras en proceso de fermentación se sellaron y fueron guardadas en condiciones de poca luz, simulando su ambiente nativo.

Aislamiento e identificación de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).

Aislamiento por morfología colonial.

Después de la siembra por estriado en cajas Petri con medio de cultivo Agar MRS se aislaron por morfología colonial (Tabla 7), un total de 6 cepas bacterianas. Las cuales fueron resembradas como se puede observar en la Figura 5.

Tabla 7

Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas en Agar MRS

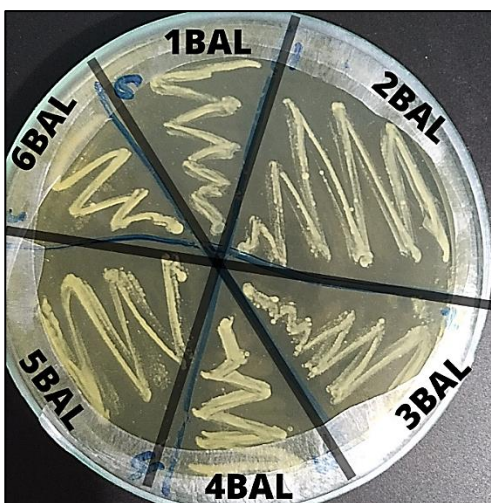
Cepa	Forma	Pigmentación	Aspecto	Elevación
1BAL	Puntiforme	Blanquecino	Brillante	Plana
2BAL	Puntiforme	Blanquecino	Opaca	Elevada

Cepa	Forma	Pigmentación	Aspecto	Elevación
3BAL	Circular	Blanquecino	Opaca	Plana
4BAL	Irregular	Blanquecino	Opaca	Plana
5BAL	Puntiforme	Blanquecino	Opaca	Convexa
6BAL	Circular	Amarillento	Opaca	Convexa

Nota: Para mejorar la visualización de las colonias se utilizó una lupa.

Figura 5

Cepas bacterianas aisladas por morfología colonial



Nota: La tonalidad amarillenta en la imagen se debe al medio de cultivo AGAR MRS.

Identificación bioquímica de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las 6 cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo Agar MRS fueron sometidas a tinción Gram (Figura 5), prueba de oxidasa y prueba de catalasa (tabla 8) de las cuales la cepa “3BAL” y “6 BAL” se descartaron por ser catalasa positivas.

Tabla 8

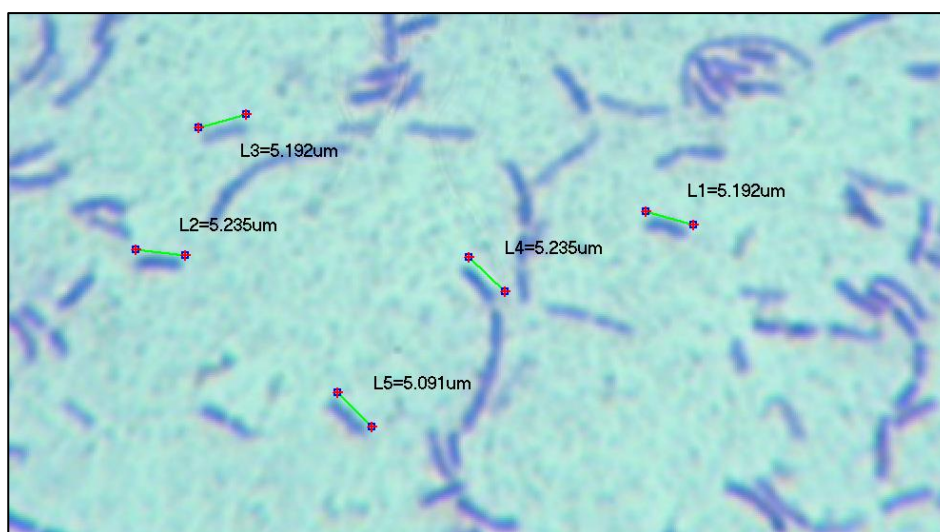
Resultados de las pruebas bioquímicas sometidas a las cepas bacterianas aisladas

Cepa	Tinción Gram	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa
1BAL	+	-	-
2BAL	+	-	-
3BAL	+	+	-
4BAL	+	-	-
5BAL	+	-	-
6BAL	+	+	-

Nota: Las cepas "1BAL", "2BAL", "4BAL", "5BAL" fueron resembradas en medio de cultivo Agar MRS.

Figura 6

Tinción Gram de la cepa "2BAL"



Nota: Se muestran las longitudes de BAL con un promedio de longitud de 5.189 (μm).

Tabla 9

Morfología y longitud media de BAL aisladas

Cepa	Morfología	Longitud Media (μm)
1BAL	Bacilo	4.146
2BAL	Bacilo	5.189
4BAL	Bacilo	2.184
5BAL	Bacilo	3.234

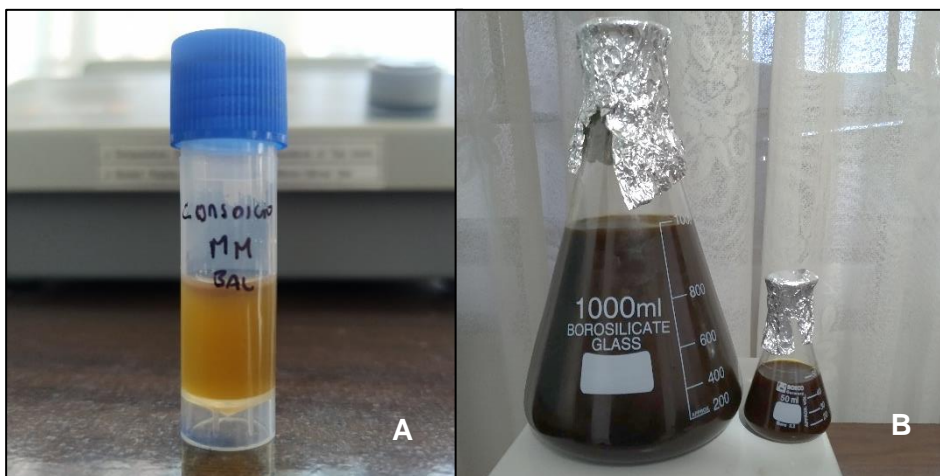
Nota: La longitud media se determinó mediante el software Scopelimage 9.0.

Generación del Consorcio Bacteriano y Escalado a Biorreactor.

De la resiembra realizada a las 4 cepas BAL, se extrajo por raspado cada una y, se inocularon en 1 ml de caldo MRS (Figura 7), homogenizando manualmente, y se procedió al escalado de 50 mL a 1000 mL y posteriormente 10000 mL (Figura 8).

Figura 7

Escalado del consorcio de bacterias ácido-lácticas



Nota: (A) consorcio bacteriano en 1 mL de caldo MRS; (B) escalado a partir de 50 mL a 1000 mL, que posteriormente serán inoculados al biorreactor de 10000 mL.

Diseño y Construcción del Biorreactor

Primeramente, se estableció la cantidad de producción de bacterias ácido-lácticas al mes. Por ello se determinó una producción de 75 L de BAL al mes. La fermentación de este tipo de bacterias dura de 3-4 días, por lo que se decidió marcar un promedio de fermentación de 3.5 días. El biorreactor tendrá una limpieza profunda 1 vez por semana por lo que operará 26 días a lo largo del mes. Por tanto:

$$V_{util} = \frac{75 \text{ L}}{\text{mes}} \cdot \frac{\text{mes}}{26 \text{ días}} \cdot \frac{3.5 \text{ días}}{\text{fermentación}} = 10,09 \text{ L} \approx 10 \text{ L} \quad (\text{Ec. 1})$$

Geometría del biorreactor

Ya calculado el volumen útil del biorreactor (Ec.1). Se realizó el cálculo del volumen total del biorreactor de la siguiente manera:

$$V_{util} = 70\% * V_{total}$$

$$V_T = \frac{V_{util}}{0,7} = \frac{10000 \text{ cm}^3}{0,7} = 14285,71 \text{ cm}^3 \quad (\text{Ec. 2})$$

Conocido el volumen total del biorreactor se realiza los cálculos de la geometría del mismo (Anexo 3), empezando con la altura (h) del fermentador:

$$\text{Sabiendo que el diametro } d = \frac{6h}{7} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$h = \frac{4(V_T)}{\pi d^2} \quad (\text{Ec. 4})$$

(Ec. 3) en (Ec. 4)

$$h = \sqrt[3]{\frac{49}{9} \cdot \frac{V_T}{\pi}} = \sqrt[3]{\frac{49}{9} \cdot \frac{(14285,71 \text{ cm}^3)}{\pi}} = 29,14 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 5})$$

Por lo tanto, utilizando la (Ec. 3) el diámetro del fermentador es:

$$d = \frac{6h}{7} = \frac{6 \cdot (29,14 \text{ cm})}{7} = 24,97$$

Sistema de agitación

Para la óptima agitación del biorreactor se eligió paletas tipo compuerta de barrido lateral (Anexo 4). Se empezó dimensionando el agitador de la siguiente manera:

$$\text{ancho del agitador } D = \frac{2d}{3} = \frac{2(24,97 \text{ cm})}{3} = 16,64 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\text{longitud del agitador } S = \frac{2d}{3} = \frac{2(24,97 \text{ cm})}{3} = 16,64 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\text{distancia agitador - base del tanque } C = \frac{d}{6} = \frac{(24,97 \text{ cm})}{6} = 4,16 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 8})$$

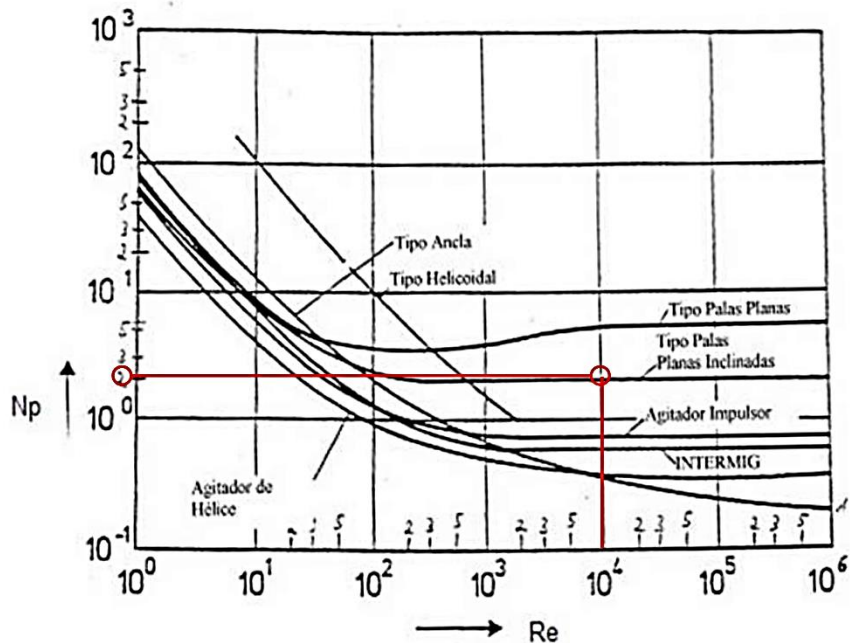
$$\text{anchura alabe } W = \frac{D}{8} = \frac{(16,64 \text{ cm})}{8} = 2,08 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\text{longitud alabe } L = \frac{W}{2} = \frac{(2,08 \text{ cm})}{2} = 1,04 \text{ cm} \quad (\text{Ec. 10})$$

Determinación de la potencia del motor de agitación. Se determino un numero de Reynolds $\geq 10^4$ ya que para mantener homogéneo el medio de cultivo se necesita un régimen turbulento, por lo mismo se procede a calcular el número de potencia gráficamente (Figura 9).

Figura 8

Gráfico de curvas que relaciona el número de potencia (N_p) con el número de Reynolds (Re)



Nota: La línea roja muestra la relación para tipo de palas (planas inclinadas) utilizadas en el biorreactor, por lo tanto, para un número de Reynolds $\geq 10^4$ da como resultado un N_p de $10^{0,2}$. Recuperado de (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta., 2004).

Las revoluciones por segundo para bacterias ácido-lácticas en medio de melaza disuelta en agua es 1,67 RPS (N), y la densidad de esta dilución es 1080 kg/m³ por lo que se obtuvo la potencia suministrada de la siguiente manera:

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$$

$$P = (10^{0,2}) \cdot (1080 \frac{kg}{m^3}) \cdot \left(1,67 \frac{1}{s}\right)^3 \cdot (0,1664)^5$$

(Ec. 11)

$$P = 1,017 \text{ kg} \frac{\text{m}^2}{\text{s}^3} = 1,017 \text{ W}$$

Sistema de transferencia de Calor

Para el estudio de las diferentes temperaturas se utilizó un sistema de calentamiento utilizando resistencias de 110V en la parte inferior del tanque de fermentación. La geometría del tanque se determinó de la siguiente manera:

$$\text{diametro del tanque de calentamiento } T = d \quad (\text{Ec. 12})$$

$$T = 24,97 \text{ cm}$$

$$\text{Altura del tanque de calentamiento } C = \frac{1}{3} \cdot h \quad (\text{Ec. 13})$$

$$C = \frac{29,14 \text{ cm}}{3} = 9,71 \text{ cm}$$

El sistema de calentamiento cuenta con dos tuberías, una de entrada de agua y otra de salida de agua ambas de ½ pulgada. La salida del producto se hará mediante una tubería de ¾ de pulgada en el tanque de fermentación (Anexo 3).

Construcción del biorreactor

Una vez determinadas las dimensiones, se procedió a la construcción del biorreactor. El tanque de fermentación, tanque de calentamiento, tapa y paletas de agitación fueron ensambladas y soldadas con acero inoxidable AISI 304 de grado alimenticio. Se asignó un área de 5 m² para el ensamblaje de los distintos componentes del biorreactor.

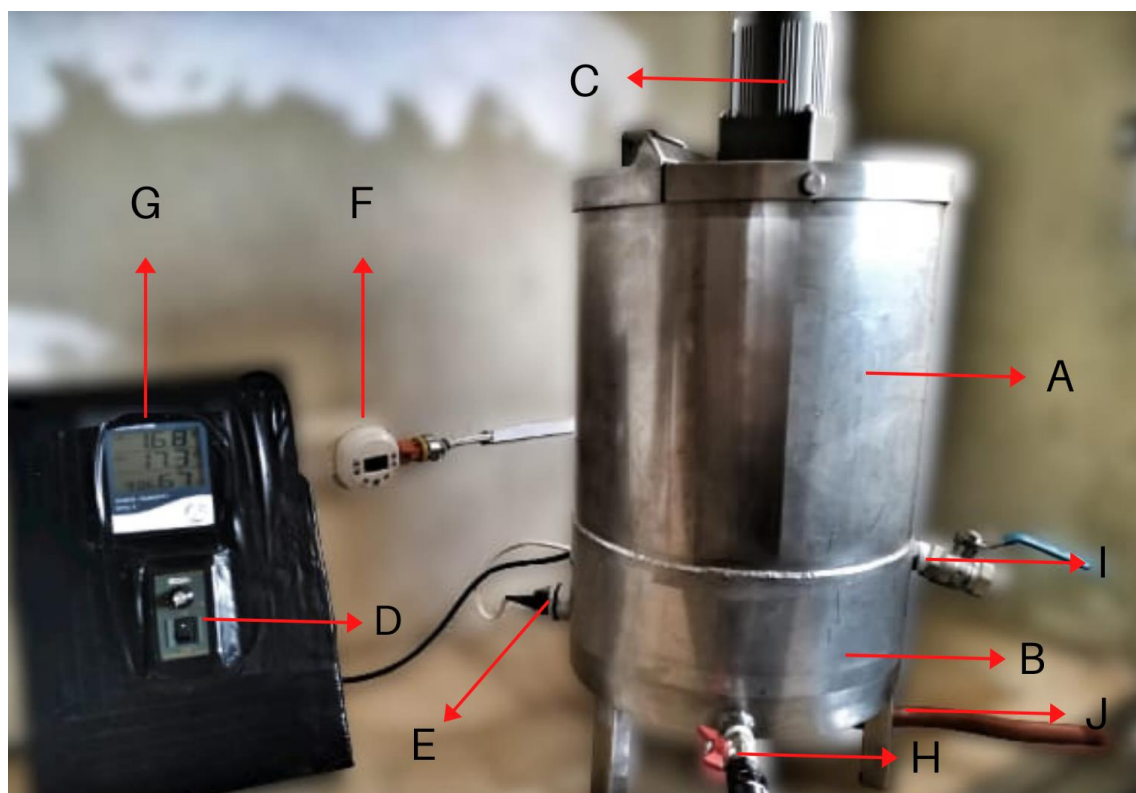
Debido al tamaño del agitador se decidió adquirir un motor de rotación marca “JWD” de 25 W, junto con un motorreductor regulable para cumplir la potencia requerida

de la (Ec. 11). La resistencia de calentamiento de voltaje 110V fue acoplada en el tanque inferior mediante una entrada de 1 pulgada.

El control de temperatura se realizó mediante un termohigrómetro con sonda de la marca "HTC-2". La resistencia de calentamiento se conectó a un Timer General Electric para que se prenda cada hora durante 2 minutos.

Figura 9

Biorreactor tipo Batch construido y ensamblado



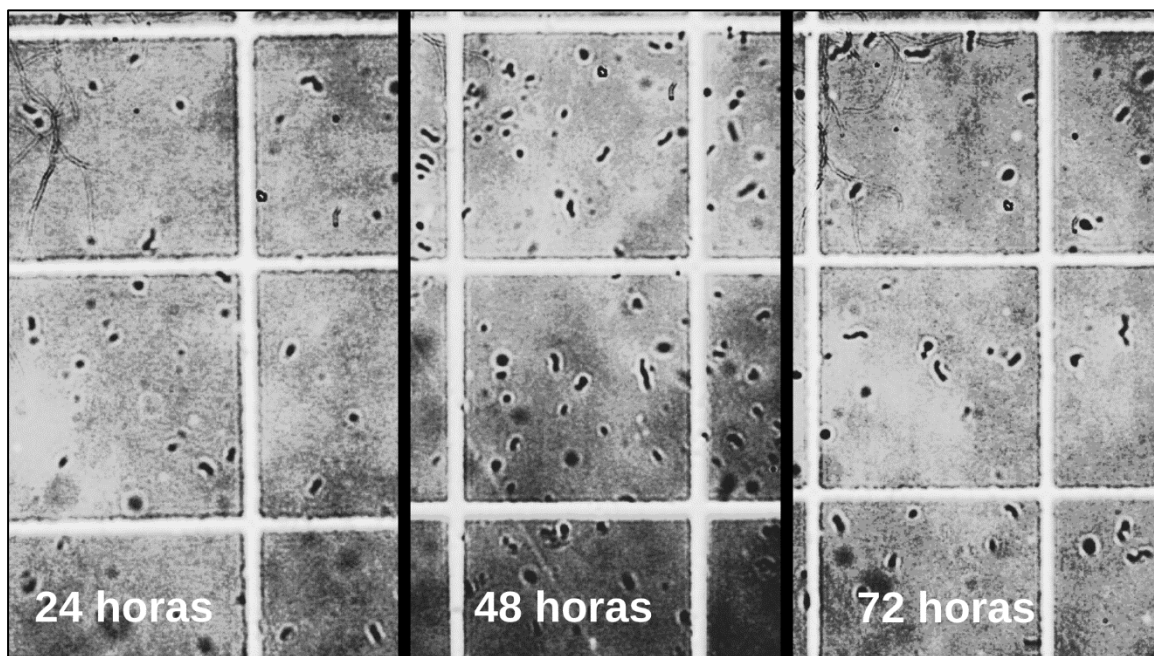
Nota: (A) Tanque de Fermentación; (B) Tanque de calentamiento; (C) Motor 25W; (D) Motorreductor; (E) Resistencia de calentamiento conectada; (F) Timer GE; (G) Termohigrómetro con sonda; (H) Entrada agua; (I) Salida de producto; (J) Salida agua.

Análisis de Conteos Bacterianos.

Se realizó los conteos de bacterias ácido-lácticas en el cuadrado secundario central de la cámara de Neubauer (Figura 11), los cuales en tiempo real se les asignó un filtro de imagen(equalize) para mejorar su visualización a través del software de procesamiento de imágenes ScopelImage V9.0. En el Anexo 2 se muestra el total de conteos realizados a distintas temperaturas con una disolución de muestras 10^{-2} .

Figura 10

Cuadrado secundario central (40x), a distintas horas de fermentación



Nota: En la figura se puede observar el crecimiento en la población de BAL. Algunas líneas y manchas de color oscuro en la imagen son por fallas en el lente del microscopio.

Análisis Estadístico con RStudio V1.3

Para el análisis estadístico se analizan los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante el software estadístico RStudio V1.3 con un nivel de significancia de 0.05. Ya que la muestra es $n > 50$ se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov Normality Test:

```
##
##  Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
##
## data:  datos$BAL
## D = 0.13885, p-value = 2.649e-15
```

Como se puede observar el análisis Kolmogórov-Smirnov da un valor-p de 2.649×10^{-15} (menor a 0.05) por lo que se rechaza la hipótesis de normalidad y los datos no cumplen con el supuesto de normalidad. Para el análisis de homocedasticidad se utilizó la prueba de Bartlett Test para ambos factores (temperatura y tiempo):

```
##
##  Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data:  BAL by horas
## Bartlett's K-squared = 110.93, df = 9, p-value < 2.2e-16
##
##  Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data:  BAL by temperatura
## Bartlett's K-squared = 0.11614, df = 1, p-value = 0.7333
```

El valor-p para “temperatura” y “horas” son 0,7333 y 2.2×10^{-16} respectivamente por lo que el factor “horas” no cumple (mayor a 0.05) con el supuesto de homocedasticidad mientras que el factor “temperatura” si lo hace (menor a 0.05).

En vista de la falta del supuesto de normalidad y del supuesto de homocedasticidad en el factor “horas”, se evitó métodos clásicos de análisis estadísticos

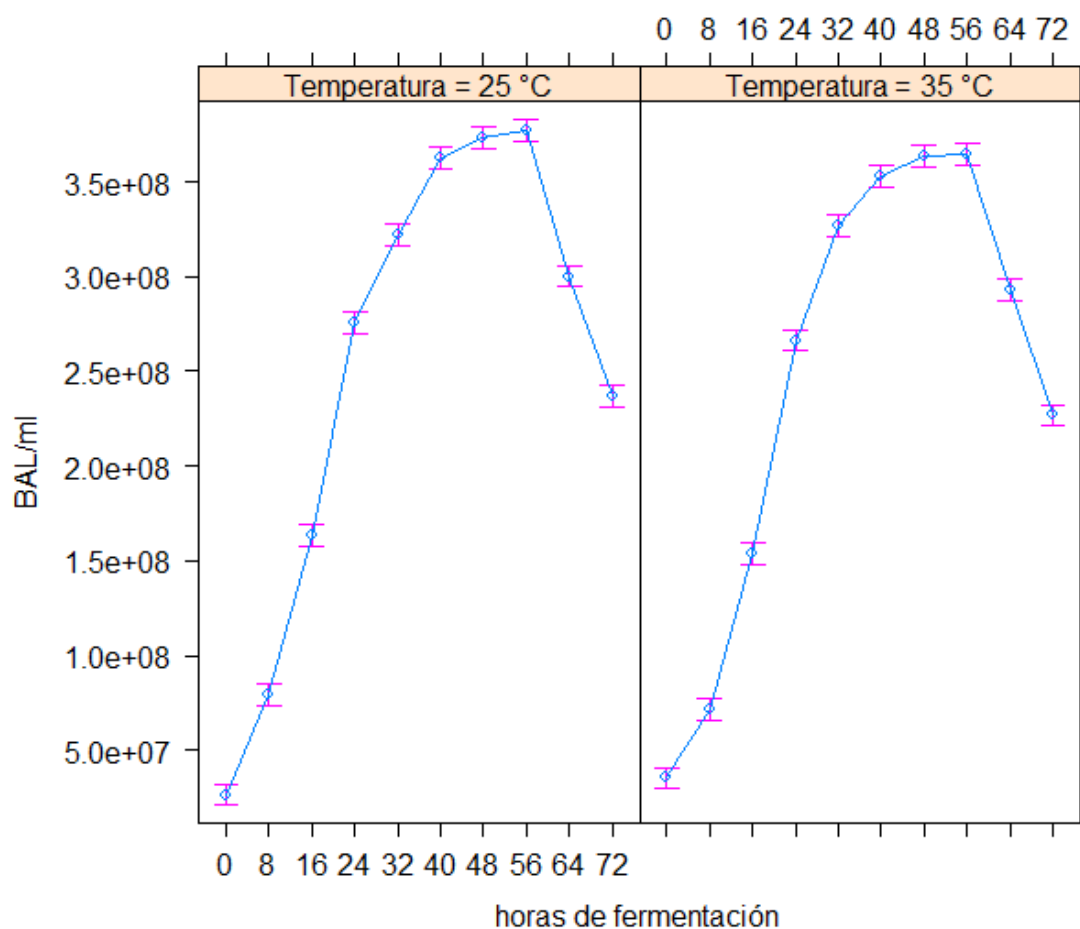
(ANOVA, T-STUDENT, etc.) y se realizó el análisis de varianza mediante métodos robustos como la prueba de Welch's:

```
##
##  Welch's Heteroscedastic F Test (alpha = 0.05)
## -----
##  data : BAL and temperatura
##
##  statistic   : 0.2314036
##  num df      : 1
##  denom df    : 297.7672
##  p.value     : 0.6308383
##
##  Result      : Difference is not statistically significant.
## -----
##
##  Welch's Heteroscedastic F Test (alpha = 0.05)
## -----
##  data : BAL and horas
##
##  statistic   : 7505.878
##  num df      : 9
##  denom df    : 117.5387
##  p.value     : 9.214118e-158
##
##  Result      : Difference is statistically significant.
## -----
```

Los resultados de la prueba de Welch's indican que no existe diferencia significativa en las temperaturas de fermentación estudiadas (25°C y 35°C), pero si existe respecto al tiempo de fermentación. En la Figura 12 se puede observar de mejor manera estos resultados, en donde se muestra la similitud en la tendencia de crecimiento bacteriano para las dos temperaturas.

Figura 11

Gráfico de interacción respecto a la producción de BAL (bacterias ácido-lácticas)



Nota: El gráfico de interacción fue realizado con los datos de crecimiento bacteriano del Anexo 2.

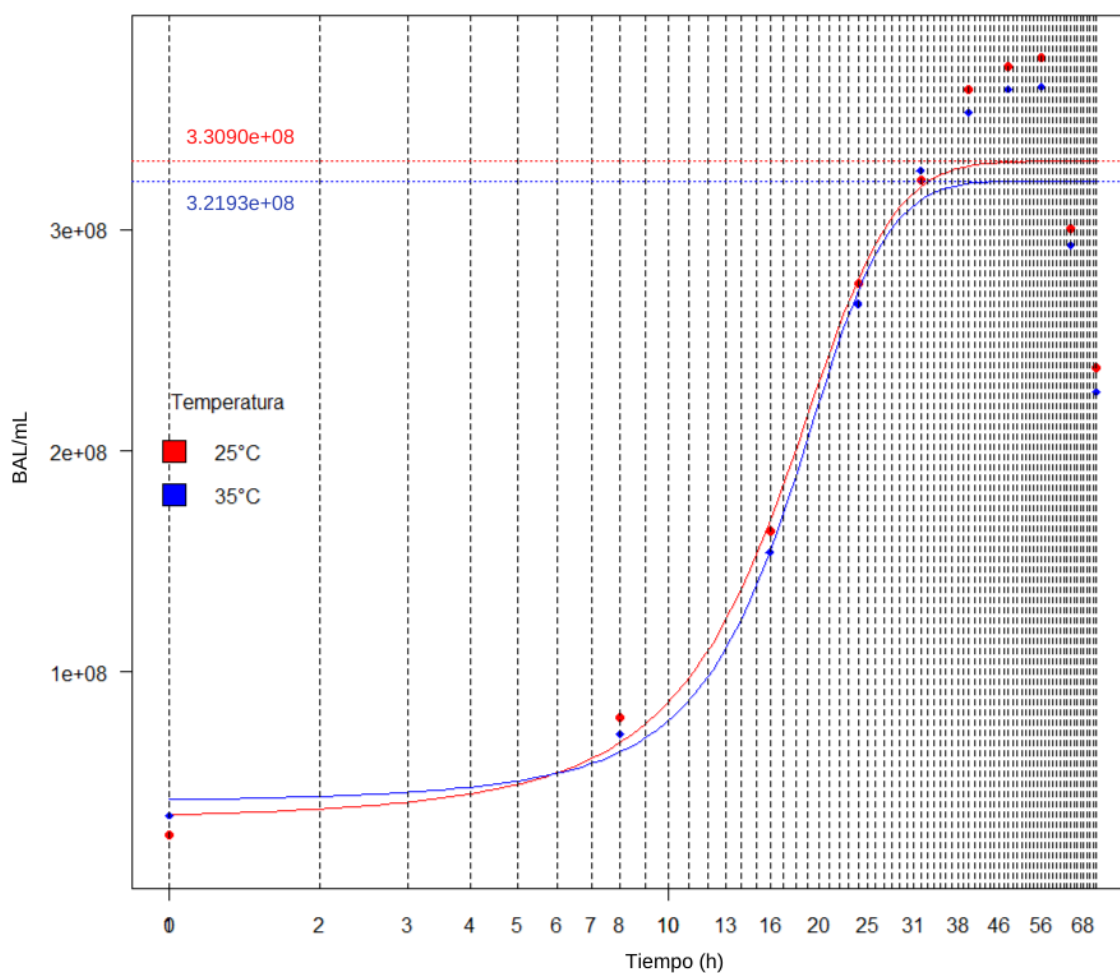
Determinación de la cinética bacteriana.

El gráfico logarítmico de la Figura 13 muestra las distintas fases de crecimiento bacteriano (Tabla 10), aplicando un modelo logístico con la función “drm()” del paquete “drc” en RStudio V1.3. De la misma forma, se determinó las cifras de máxima

producción sostenible para cada temperatura, junto con los parámetros para determinar la ecuación de crecimiento bacteriano.

Figura 12

Modelo de regresión logística



Nota: Las cifras en rojo ($3.3090 \cdot 10^8$), y en azul ($3.2193 \cdot 10^8$) de 25° y 35°C respectivamente corresponden a las asintotas de máxima producción sostenible que se encuentran en la fase estacionaria de la curva.

Tabla 10*Parámetros obtenidos del modelo logístico*

Parámetro	Sigla	T: 25°C	T: 35°C
r (tasa de crecimiento)	b	-0.20880	-0.23809
No (población inicial)	c	$2.4024 \cdot 10^7$	$3.6764 \cdot 10^7$
K (capacidad de carga)	d	$3.3090 \cdot 10^8$	$3.2193 \cdot 10^8$
t_mid (tiempo medio)	f	16.533	17.443

Nota: Los parámetros fueron obtenidos con la función L.4() en RStudio V1.3

Tabla 11*Fases de crecimiento a distintas horas de fermentación*

Fases de crecimiento	Horas (25°C)	Horas (35°C)
Fase de retraso	0-4	0-5
Fase de aceleración positiva	4-13	5-13
Fase de crecimiento logarítmico	13-26	13-24
Fase de desaceleración o retardo	26-42	24-42
Fase estacionaria	42-66	42-66
Fase de declinación o muerte	66-72	66-72

Nota: Las horas se determinaron gráficamente usando la Figura 13.

Con el uso de la tabla 10 se determinó la ecuación de crecimiento bacteriano mediante la siguiente función logística:

$$f(x(b, c, d, f)) = c + \frac{d - c}{1 + e^{(b(x-f))}} \quad (\text{Ec. 14})$$

En donde los parámetros (b, d, c, f) se especifican en la Tabla 9, y “x” es el tiempo de fermentación (t), por lo tanto, las ecuaciones de crecimiento bacteriano a distintas temperaturas son las siguientes:

Ecuación para una temperatura de 25°C

$$\left(\frac{BAL}{ml}\right) = 2.4024 \cdot 10^7 + \frac{3.0688 \cdot 10^8}{1 + e^{(-0.2088(t-16.533))}} \quad (\text{Ec. 15})$$

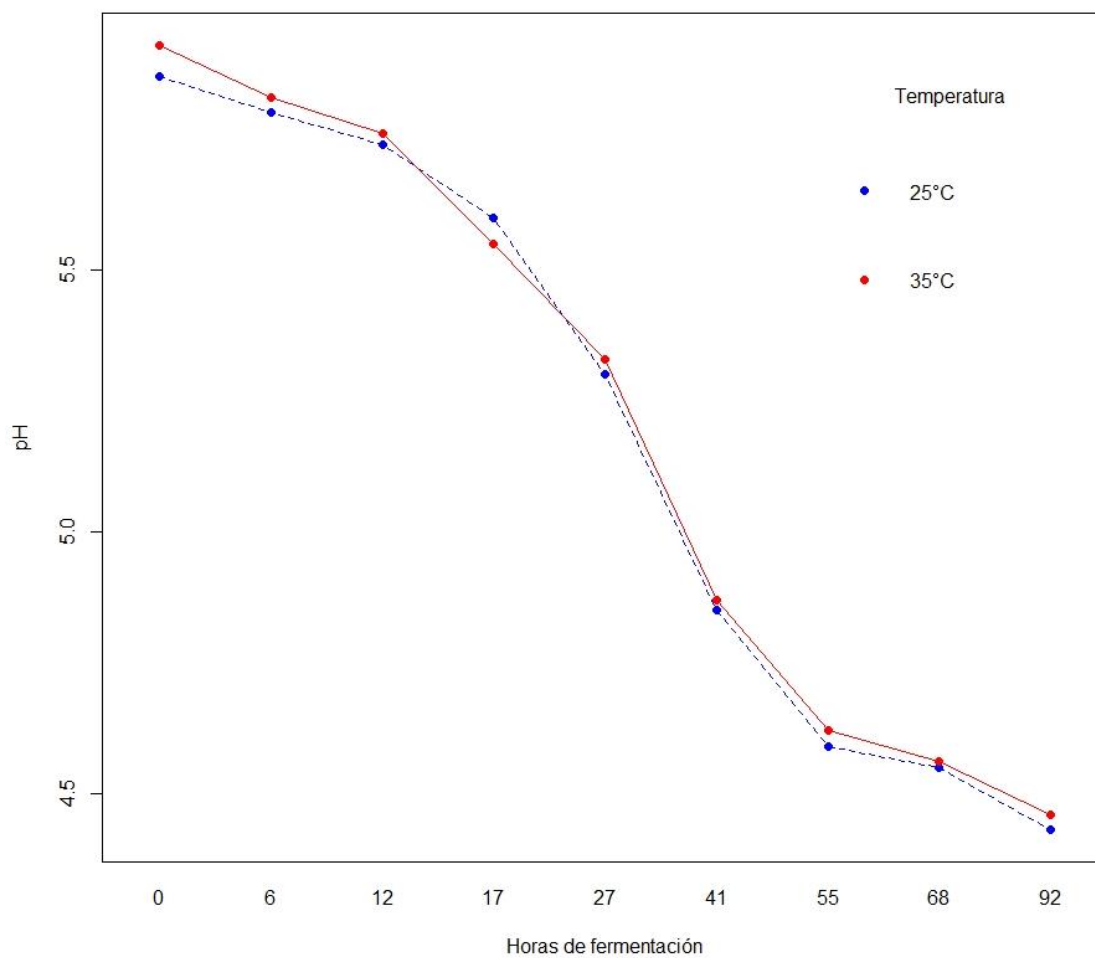
Ecuación para una temperatura de 35°C

$$\left(\frac{BAL}{ml}\right) = 3.6764 \cdot 10^7 + \frac{2.8517 \cdot 10^8}{1 + e^{(-0.2381(t17.443))}} \quad (\text{Ec. 16})$$

Otro de los factores que fue analizado es la disminución de pH producida por la producción de ácido láctico (Figura 14), en donde se muestra la similitud entre ambas temperaturas, los datos de la gráfica se encuentran en el Anexo 6.

Figura 13

pH vs tiempo a diferentes temperaturas



Nota: En la figura se observa claramente la similitud respecto a la disminución de pH para ambas temperaturas.

Capítulo 4. Discusión

La tendencia a evitar el uso de agroquímicos en el suelo abre nuevos caminos relacionadas al manejo y aprovechamiento de microorganismos nativos de bosques primarios, los cuales, según Campo, Rosa, Morales, & Alonso, (2014) tienen el potencial de fertilizar el suelo, mediante la descomposición de materia orgánica, esto produce un fortalecimiento de la flora nativa del lugar, recuperando suelos infértiles que han sido expuestos a agroquímicos. Para aislar este tipo de microorganismos se eligió el bosque primario de la parroquia Mindo-Nambillo como zona de muestreo (Castro, 2014). En donde, la temperatura del suelo osciló entre 21 y 23°C, junto con un pH de aproximadamente seis (Tabla 6), estos parámetros presentan condiciones correctas para el crecimiento de microorganismos mesófilos en el suelo (Feijoo, 2016).

La activación de microorganismos de montaña mediante el uso de sustrato de fermentación durante 20 días disminuyó el pH a 4.45, demostrando la correcta activación por la disminución de acidez. Para el aislamiento diferencial de bacterias ácido-lácticas a partir de las muestras anteriormente mencionadas, se utilizó el medio selectivo Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) el cual tiene componentes adecuados para el desarrollo de BAL, ya que contiene agentes inhibitorios como el citrato de amonio que no permiten el crecimiento de bacterias Gram negativas, junto con algunas sales que proporcionan un óptimo crecimiento (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960).

Se aislaron un total de 6 cepas bacterianas mediante morfología colonial (Tabla 7). En el análisis bioquímico (Tabla 9) se determinó que todas las cepas aisladas son Gram positivas esto debido al medio diferencial Agar MRS. Además, presentan un tamaño medio de entre 2-6 μm (Tabla 8), concordante con el rango de tamaño

aproximado de bacterias ácido-lácticas, especialmente del género *Lactobacillus spp.* (Parrott-Sheffer , 2010).

Por otra parte, en las pruebas de Catalasa y Oxidasa, las cepas “3BAL” y “6BAL”, presentaron la formación de burbujas (oxígeno) al someterse al peróxido de hidrógeno por lo que su metabolismo tiene presencia de la enzima catalasa. Ninguna de las cepas aisladas presentó reacción positiva al N, N- dimetil-1,4-fenilendiamonio por lo que no existe presencia del citocromo-oxidasa en el metabolismo de estas cepas. Esto es concordante con el estudio de tinción Gram ya que las bacterias Gram positivas son por lo general oxidasa negativas (American Society for Microbiology , 2013). Por consiguiente, a partir de estos resultados (Tabla 2), ambas cepas fueron descartadas dentro del estudio.

El diseño del biorreactor se enfocó en la disminución de costos y aumentar la accesibilidad a fermentadores pilotos en estudios biotecnológicos, por ello basándose en equipos de la industria alimenticia, se decidió diseñar un biorreactor tipo Batch de acero inoxidable AISI 304, minimizando así la contaminación por microorganismos patógenos (Karanthand & Raj, 2006). Las bacterias ácido-lácticas al tener un metabolismo anaerobio facultativo permiten su crecimiento en condiciones de anaerobiosis (Huertas, 2010). Por consiguiente, para disminuir costos energéticos se resolvió no instalar un sistema de entrada de gases.

Como se puede observar en la (Ec.2) el dimensionamiento se pensó para trabajar con el 70 % de capacidad, dejando así una parte como zona de seguridad. Por lo tanto, el volumen total del tanque de fermentación es de aproximadamente 14 L. La melaza diluida al 20 %, tiene una densidad de 1.08 g/mL, pero al momento de la mezcla

tiene tendencia a quedarse en las paredes y base del tanque de fermentación, por lo tanto en el Anexo 5, se muestra el dimensionamiento total del equipo, que contiene un sistema de agitación mediante paletas tipo compuerta de barrido lateral, el cual fue elegido por ser óptimo para barrer o raspar las paredes del tanque y mejorar la transferencia de calor en el medio de cultivo (Perry, 2006).

La potencia requerida calculada para este sistema de agitación fue de 1,017 W, sin embargo, para una mejor diversidad de usos posteriores, se decidió instalar un motor de 25 W “JDW” de potencia con un motorreductor que permita regular las RPM de entre 10 a 250, siendo 100 RPM la velocidad de agitación adecuada para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas en melaza al 20 % p/v (Ossa, Venegas, & Badillo, 2010).

El equipo al ser pequeño se optó por un sistema de calentamiento utilizando una resistencia en forma de “U” en el tanque inferior, que permiten la pasteurización del medio de cultivo en el tanque de fermentación y posteriormente el mantenimiento de la temperatura. Para lograr un control correcto de temperatura la resistencia de 110 V fue conectada a un “timer programable” de la marca “General Electric”, el cual encendía el calentamiento cada hora durante 2 minutos, esto permitía que la temperatura no disminuya durante los 3 días de fermentación.

Para determinar la concentración mínima del consorcio bacteriano, usada para el escalado a 10 L de medio de cultivo, se estableció un crecimiento base por 3 días en un matraz Erlenmeyer de 50 mL de volumen. Por lo tanto, el inóculo inicial presentó una concentración mínima de 3×10^6 BAL/mL, para todos los tratamientos estudiados, garantizando la estabilidad de crecimiento y de los análisis comparativos estadísticos de

ambas temperaturas. El conteo en cámara de Neubauer determinó dos fases acentuadas (Figura 9), una en donde se evidencia el aumento sustancial de BAL/mL durante 56 horas y su posterior reducción para ambas temperaturas (25°C y 35°C).

Con anterioridad para el análisis estadístico se planteó el estudio comparativo mediante Análisis de Varianza (ANOVA), para ello en primer lugar se debía cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos de crecimiento obtenidos (Ritz & Streibig, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnof, muestran un p-value < 0.05, esto indica la falta de la condición de normalidad en los datos. Por otra parte, según Sainani (2012) para muestras grandes (más de 30 datos) no es una preocupación la ausencia del supuesto de normalidad ya que no afecta significativamente el análisis estadístico.

Para los supuestos de homocedasticidad de las variables se utilizó la prueba de Bartlett que estudia si las muestras provienen de poblaciones con varianzas homogéneas (Nist/Sematech, 2013). Los resultados de esta prueba indican la falta de homocedasticidad en la variable "Tiempo(h)" (p-value < 0,05), por lo que se concluyó evitar el uso de pruebas estadísticas clásicas como el ANOVA, para evitar sesgar los datos.

Para sustentar la falta de normalidad y homocedasticidad, se utilizó modelos estadísticos robustos que solucionan el impacto negativo de la heterogeneidad de las varianzas (Vallejo, Fernández, & Rojas, 2010). La prueba robusta de Welch-James desarrollada por Johansen (1980) fue utilizada para estudiar diferencias entre las variables. Los resultados indican que existe diferencia significativa (p-value<0,05) en la variable "Tiempo (h)", esto debido al crecimiento de las bacterias ácido-lácticas, en

razón de BAL/mL a través del tiempo, sin embargo, la variable “Temperatura” no evidenció diferencia significativa, esto es concordante con el estudio de Ossa, Venegas, & Badillo (2010) el cual presencia la falta de variabilidad en el crecimiento de *Lactobacillus Plantarum* a distintas temperaturas (25°C y 35°C).

La falta de diferencia significativa para la variable “Temperatura” es favorable para este tipo de bioprocesos, ya que disminuye los costos energéticos relacionados a la producción de biomasa. La transferencia de calor también se ve beneficiada con este supuesto estadístico, ya que a temperatura de 25°C, se produce más rápidamente el calentamiento y mantenimiento de la temperatura del medio de cultivo durante varios días (Teusink & Smid, 2006).

La cinética de crecimiento determinada mediante la función logística en RStudio V1.3 evidenció las distintas fases de crecimiento (Tabla 11), en donde podemos observar que la llegada a la fase logarítmica de crecimiento fue más rápida a 25°C, esto se debe a que la temperatura media anual de la parroquia Mindo oscila entre 19-23°C, por lo que este consorcio al ser nativo de esta ubicación presenta una rápida adaptabilidad (Atlas & Barthe, 2002). Por el contrario, ambas temperaturas llegan a la fase estacionaria a la misma hora por lo que se corrobora que no existe diferencia significativa entre ambas, respecto al crecimiento bacteriano.

Además, los parámetros cinéticos (Tabla 10), determinaron la máxima producción sostenible o capacidad de carga (K) de 3.31×10^8 BAL/mL y 3.22×10^8 BAL/mL para 25°C y 35°C respectivamente. Estos valores son de suma importancia ya que indican en que tiempo el crecimiento de la población bacteriana llega al nivel de saturación. (Ulloa Ibarra, 2010). El consumo de los distintos azúcares y nutrientes de la

melaza suele aumentar a temperaturas altas, pero los resultados mostrados demuestran un leve aumento en el recuento a una temperatura de 25°C (Ortiz, y otros, 2008). De igual forma en la Figura 14, se muestra que existe una leve disminución de pH a 25°C. Por lo tanto, se corrobora que no existe diferencia significativa entre estos dos factores (25°C y 35°C)

Para finalizar la cuantificación de microorganismos es de importancia crítica en la industria ya que pretende resolver si existen efectos benéficos o perjudiciales cuando se realizan cambios en parámetros de fermentación (Corral, Morales, & Pazos, 2012). Por ello las ecuaciones cinéticas (Ec. 15) y (Ec.16), para las temperaturas de 25°C y 35°C respectivamente, ayudan a determinar la cantidad de bacterias ácido-lácticas a cualquier tiempo de fermentación.

Conclusiones

El aislamiento mediante medio diferencial Agar MRS a partir de la microbiota de hojarasca de la parroquia Mindo, determinó 6 cepas bacilos Gram positivos, 4 de ellas identificadas como bacterias ácido-lácticas después de realizar los análisis de identificación bioquímica.

El dimensionamiento del biorreactor determinó un volumen útil de 10000 mL y un volumen total de 14200 mL. Además, una potencia de 1.017 W para el agitador tipo compuerta para el mezclado en el tanque de fermentación. Por otra parte, se acopló un motorreductor junto con un termohigrómetro para mejorar el manejo del equipo.

El consorcio generado con las 4 cepas se cultivó en una solución con melaza al 20 % p/v en un volumen de 50 mL, el cual posteriormente fue escalado al volumen útil del biorreactor de 10000 mL. Mediante recuentos en cámara de Neubauer se determinó una concentración mínima de inóculo de 3×10^6 BAL/mL.

El análisis estadístico determinó que no existe diferencia significativa en el crecimiento a diferentes temperaturas (p valor: 0.6308), por lo que se concluye que el crecimiento de bacterias ácido-lácticas es similar a 25°C y 35°C.

Los costos energéticos son un factor fundamental al momento de estudiar un bioproceso. Por lo tanto, al no encontrar diferencia significativa entre ambas temperaturas, se eligió una temperatura óptima de crecimiento a 25°C.

La cinética de crecimiento mediante la función logística permitió determinar que el tiempo óptimo para llegar a la fase estacionaria de crecimiento, respecto a ambas temperaturas es de 42 horas. Además, se obtuvo una máxima producción sostenible de 3.31×10^8 BAL/mL y 3.22×10^8 BAL/mL para 25°C y 35°C respectivamente.

Recomendaciones

La asepsia del biorreactor debe ser controlada para llevar un correcto control de calidad, esto se puede realizar limpiando constantemente el equipo, evitando así contaminación cruzada.

Programar correctamente el “timer” que está conectado a la resistencia de calentamiento, para evitar daños en el equipo por sobrecalentamiento. Además, mantener un control de agitación para evitar sobrecarga de energía en el motor, lo recomendado por el fabricante es trabajar con intervalos de “ON” por 30 minutos y “OFF” por 10 minutos.

Emplear otros tipos de identificación ya sea molecular (secuenciación) o bioquímica (API 50 CHL) de las cepas aisladas, para corroborar con qué tipo de bacterias ácido-lácticas estamos trabajando y así mejorar el estudio del crecimiento de estas.

Bibliografía

- Akiko, A., & Shurtleff, W. (2004). *A Brief History of Fermentation, East and West*. Soyfoods Center.
- American Society for Microbiology . (2013). Oxidase Test Protocol. *ASM MicrobeLibrary*, 1-9.
- Atlas, R., & Barthe, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología*. . Addison Wesley.
- Axelsson, L. (1993). *Lactic acid bacteria classification and physiology*. Ed Nueva York: Marcel Dekker.
- Báez, E., & González, G. (2017). *Evaluación de bacterias ácido lácticas y Bifidobacterias con potencial probiótico en leche materna y heces de lactantes en el municipio Acevedo*. Venezuela: Universidad de Carobo. Retrieved from Lifeder.
- Bedolla, S. (2012). In *Introducción a la Tecnología de los Alimentos 2a. ed.* (p. 78). México: Limusa.
- Bedón, L., & Quintana, M. (2018). *AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS ÁCIDO-LACTICAS PARA FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE FORRAJES*. Sangolquí: Centro de Posgrados-ESPE.
- Benz, G. (2011). *Bioreactor design for chemica engineers*. *Benz Technology International*.
- Blanco, S., Delahaye, P., & Fragenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Facultad de Agronomía (Maracay)*

Venezuela, 131-144.

Buelvas, G., Patiño, J., & Restrepo, C. (2012). Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío,. *Lasallista de Investigación*, 55-64.

Campo, A. d., Rosa, A., Morales, S., & Alonso, P. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM). En la producción de acelga en la meseta de popayan. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 79-87.

Carr, F., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 281-370.

Castro, L. (2014, Abril). *¿Cómo hacer microorganismos de montaña (MM) ?* Retrieved from CIA-UCR: <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Brochure-MicroCIA-VF-2017web.pdf>

Chaves, G., Ortiz, M., & Ortiz, L. (2013). Effect of agrochemicals on soil microorganisms of a rice culture. *Scielo*, 1-7.

Chiari, P. (2015). *Efecto de las raciones verdes inoculadas con microorganismos de montaña en la producción y calidad de leche caprina*. Costa Rica: Escuela de Posgrado del CATIE.

CIEC. (2013, Marzo 18). *Chemical Reactors*. Retrieved from Essential Chemical Industry: <https://www.essentialchemicalindustry.org/processes/chemical-reactors.html>

Corral, A., Morales, Y. E., & Pazos, L. A. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo".

Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV, 147-156.

Corry, J., Curtis, G., & Baird, R. (2003). *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. volume 37: Elsevier Science.

De Man, J., Rogosa, M., & Sharpe, M. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*, 130.

EFE. (2017, Julio 22). La bioeconomía podría representar el 20% del PIB de Ecuador en varios años. *EL Comercio*.

Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2006). *Microbiología Industrial*. Washington: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.

Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2006). *Microbiología Industrial*. Washington, Washington, DC: Science.

Feijoo, M. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. . *Científica Agroecosistemas*, 31-40.

García, S., & Lazovski, J. (2011). *Guía de Uso Responsable de Agroquímicos*. 1ra ed. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones.

Garro, J. (2016). *El suelo y los abonos orgánicos*. San José, Costa rica: INTA.

German Benavidades, A. H. (2008). Aislamiento e Identificación de Flora Bacteriana Nativa del Suelo de los Paramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). *Pontificia Universidad Javeriana*.

Guzñay, C. (2015). *Guía agroecológica para una agricultura resiliente en la parte baja de la Subcuenca del río Daule*. Santa Lucía: Agrónomos y Veterinarios Sin

Fronteras - AVSF.

- Herida, P., & Hernández, A. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*.
- Hoyos, D., Alvis, N., & Jabib, L. (2008). Utilidad de los microorganismos eficaces (EM) en una explotación avícola de Córdoba: parámetros productivos y control ambiental. *Revista MVZ Córdoba*, 1369-1379.
- Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*.
- Hughenoltz, J. (2008). Review The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production . *International Dairy Journal*, 466-475.
- Johansen, S. (1980). The Welch-James approximation to the distribution of the residual sum of squares in a weighted linear regression . *Biometrika*, 85-92.
- Karanthand, G., & Raj, E. (2006). Fermentation Technology and Biorreactor Design. 2da. edición. *Food Science and Technology*. New York.
- Kondo, S. (2015). *Producción agroecológica: Agricultura orgánica I. Documento técnico de PROPA-Oriente*. MAG. Retrieved from Documento técnico de PROPA-Oriente. MAG, El Salvador:
https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/booklet_01.pdf
- Lopez, M. (2013). *Catalasa y oxidasa*. Retrieved from Universidad de Granada:
https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm
- Merchuk, J. (2007). *Microbiología Industrial*. Washington, D.C.: F Street N.W.

- Mitchell, D., Von Meien, O., & Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation; heat and mass transfer in bio-reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 137-147.
- Moncayo, G. (2008). Dimensionamiento, diseño y construcción de biodigestores y plantas de biogas. *Aqualimpi Beratende ingenieure*, 607-608.
- NCBI. (2019). *Taxonomy*. Retrieved from National Center For Biotechnology: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
- Nguyen, H., Elegado, F., Librojo, N., Mabesa, R., & Dizon, E. (2010). Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua, a traditional fermented meat from Vietnam. *Beneficial microbes*, 67-74.
- Nist/Sematech. (2013, Diciembre). *e-Handbook of Statistical Methods*. Retrieved from Test de Bartlett: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda357.htm>
- Ortiz, A., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., . . . Quevedo, H. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Sacharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum (Colombia)*, 138-148.
- Ossa, J., Venegas, M., & Badillo, A. (2010). EVALUACIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus Plantarum*. *U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 97-104.
- Parrott-Sheffer , C. (2010). Lactic Acid Bacteria. *Brittanica*.
- Passione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: light and shadows. *Cellular and Infection Microbiology*.

- Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta. (2004). *Handbook of Industrial Mixing. Science and Practice*. New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC.
- Perry, R. (2006). *Manual del Ingeniero Químico Tomo II*. Mexico. DF: McGRAW-HILL.
- Pescumma, M. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 442-451.
- Pumarola, A. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Masson, S.A.
- Ramirez, J., & Rosas, P. (2011, Abril). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 12-15. Retrieved from UAN:
<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Ritz , C., & Streibig, J. (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software*, 1-22.
- Rivera, M., & Suárez, D. (2010). *DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIOREACTOR BATCH AEROBIO PARA CULTIVO DE BACTERIAS BIODEGRADADORAS DE PETRÓLEO*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Sainani, K. (2012). Dealing with non-normal data. *PM&R: the journal of injury, function, and rehabilitation*, 1001-1005.
- Sharma, B., & Bharti, S. (2016). Green Biotechnology and Scope of Genetically modified Crops: Facts and Prejudices. *Indian Journal of Agriculture Business*, 1-4.
- Siamansouri, M., Mozaffari, S., & Alikhani, F. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *J. Biol. Today's World*, 227-234.
- Tencio, R. (2014). *Reproducción y aplicación de MM en la actividad agrícola y pecuaria*. MAG.

- Teusink, B., & Smid, E. (2006). Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology* volume, 46-56.
- Torres, V., Barbosa, I., Meyer, R., Noda, A., & Sarduy, L. (2012). Criterios de bondad de ajuste en la selección de modelos no lineales en la descripción de comportamientos biológicos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 345-450.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Medica Panamericana.
- Ulloa Ibarra, J. (2010). El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. *REDVET*, México.
- Umaña, S., Rodríguez, K., & Rojas, C. (2017). ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Tropical Journal of Environmental Sciences*, 133-144.
- Vallejo, G., Fernández, M., & Rojas, P. (2010). Pruebas robustas para modelos ANOVA de dos factores con varianzas heterogéneas. *Psicológica*, 31.
- Vasquez, M. G. (2010). Diseño del Sistema de Control para un Biorreactor de Tanque Agitado. *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Yiu H., H., & Sherkat, F. (2006). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering* (Vol. 4). CRC Press.
- Zlokarnik, M. (2002). *Determination of the degree of mixing and the mixing time. Mixing technology, theory and practice*. Berlin.

Anexos